

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020010057696 A
 (43)Date of publication of application: 05.07.2001

(21)Application number: 1019990061074

(71)Applicant: KIM, TAI SUN

(22)Date of filing: 23.12.1999

(72)Inventor: KIM, TAI SUN

(51)Int. Cl. C07D 493 /22
 C12N 113 /00

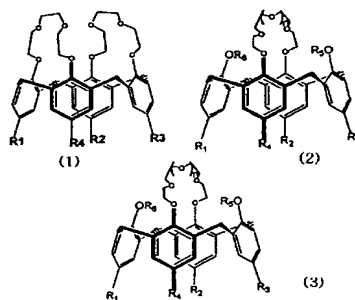
(54) NOVEL CALIXCROWN DERIVATIVES, THEIR PRODUCING METHOD, SELF-ASSEMBLED MONOMOLECULAR LAYERS PRODUCED BY THE METHOD, AND METHOD FOR FIXING PROTEIN MONOMOLECULAR LAYER USING THE SELF-ASSEMBLED MONOMOLECULAR LAYERS

(57) Abstract:

PURPOSE: The calixcrown derivatives, their producing method, self-assembled monomolecular layers produced by the method, and a method for fixing protein monomolecular layer using the self-assembled monomolecular layers are provided, thereby the calixcrown self-assembled monomolecular layers can be easily produced.

CONSTITUTION: The calix(4)arene-biscrown-4 derivatives are represented by formula (1), in which R1, R2, R3, and R4 are independently -CH2SH, or two of R1 to R4 may combines together to forms -CH2-S-S-CH2-. The calix(4)arene-crown-5 derivatives are represented by formula (2), in which n is 1; R1, R2, R3 and R4 are independently -CH2SH or R1 and R3 are individually -CH2SH and R2

and R4 are individually H; R5 and R6 are independently -H, methyl, ethyl, propyl, isopropyl and isobutyl. The calix(4)arene-crown-6 derivatives are represented by formula (3), in which n is 2; R1, R2, R3 and R4 are independently -CH2SH or R1 and R3 are individually -CH2SH and R2 and R4 are individually H; R5 and R6 are independently -H, methyl, ethyl, propyl, isopropyl and isobutyl. The calixcrown derivatives are produced by chloromethylation reacting compounds of formula (2) or (3), wherein R1, R2, R3 and R4 are H and R5 and R6 are -CH3 or compounds of formula (1), wherein R1, R2, R3, R4 are H to change 2 or 4 groups of R1 to R4 into -CH2Cl; and changing C1 group into thiol(-SH) or two C1 groups into disulfide(S-S). The protein are fixed on self-assembled monomolecular layers by dipping gold substrate in a solution containing the calixcrown derivatives for 1 to 24 hours and dipping the self-assembled monomolecular layers in a solution containing proteins having molecular weight of 20,000 dalton or more for 1 to 2 hours.



COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (20000222)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20020726)

Patent registration number (1003528150000)

Date of registration (20020902)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.
C07D 493/22
C12N 11/00

(11) 공개번호
(43) 공개일자

특2001-0057696
2001년07월05일

(21) 출원번호	10-1999-0061074
(22) 출원일자	1999년12월23일
(71) 출원인	김대선 대한민국 200-150 강원 춘천시 우두동 삼성아파트 103동103호
(72) 발명자	김대선 대한민국 135-080 대한민국강원도춘천시우두동삼성아파트103동103호
(74) 대리인	특허법인코리아나 박해선 특허법인코리아나 조영원
(77) 심사청구	있음
(54) 출원명	신규한 캘릭스크라온 유도체, 그의 제조 방법, 그를이용하여 제조된 자기조립 단분자층 및 그의 자기조립 단분자층을 이용하는 단백질 단분자층의 고정화 방법

요약

본 발명은 단백질 단분자층을 고정화시키기 위해 사용되는 자기조립 단분자층의 제조에 필수적인 화학식 1 내지 3의 캘릭스크라온 유도체 및 그의 합성 방법을 제공하는 것이다. 본 발명은 또한 화학식 1 내지 3의 화합물을 함유하는 유기 용액에 진공 증착된 금 기질을 담구어 제조되는 자기조립 단분자층, 및 이 자기조립 단분자층 상에 분자량이 20,000 (20KD) 이상의 단백질을 고정화시키는 단백질 단분자층의 고정화 방법을 제공하고자 한다.

도면

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 캘릭스크라온 유도체의 자기조립 단분자층의 제조 과정의 개략도이다.

도 2는 본 발명의 단백질 단분자층의 고정화 방법에 대한 개략도이다.

도 3은 도 2에서 제조된 단백질 단분자층의 활성을 연구하기 위하여 항원 혹은 항체의 단분자층과 용액상의 단백질과의 인식 과정을 나타내는 개략도이다.

도 4는 단백질 단분자층의 제조와 이 단백질 단분자층에 대응되는 단백질을 투여하여 실시간대에서 항원-항체 인력을 측정된 결과를 나타내는 도면이다.

도 5는 캘릭스크라온 단분자층 상에 제조된 β -갈락토시다아제 항원 단백질 단분자층을 원자힘 현미경 (Atomic Force Microscope : AFM)으로 찍은 사진이다.

도 6은 캘릭스크라온 단분자층 상에 제조된 β -갈락토시다아제 항체 단백질 단분자층을 원자힘 현미경으로 찍은 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규한 캘릭스크라온 유도체, 그의 제조 방법, 그를 이용하여 제조된 자기조립 단분자층 및 자기조립 단분자층을 이용한 단백질 단분자층의 고정화 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 다중 이온 인식에 의해 단백질을 고정할 수 있는 자기조립 단분자층의 제조에 필수적인 티올기가 부착된 신규한 캘릭스크라온 유도체 및 그의 제조 방법, 상기 캘릭스크라온 유도체를 금 기질 상에 적용하여 제조되는 자기조립 단분자층 및 그의 자기조립 단분자층을 이용한 단백질 단분자층의 고정화 방법에 관한 것이다.

효소, 항원, 항체 등을 고체 기질에 고정화하는 방법은 면역화학과 효소화학등 생명과학이나 단백질을 사용하는 분야에서 모든 분석의 가장 기본적인 기반기술이 된다. 예를 들면 생명공학분야에서 많이 사용되는 ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) 법 등은 특정한 단백질 혹은 병원을 일으키는 특이 단백질을 분석하기 위하여 실험실이나 임상의학쪽에서 많이 사용되고 있는 방법으로서, 이 방법을 사용하는데 필요한 분석용 kit가 이미 시중에서 판매되고 있다.

항체, 항원 및 효소 등의 단백질의 표면을 고정화시키는 방법은 기존에는 물리흡착방식에 의해 주로 고분자 기질이나 니트로셀룰로오스 기질에 단백질의 표면이 고정화되는 방식을 이용하고 있었으며, 최근에는 단백질과 기질표면 사이에 탄소결합을 형성하는 화학반응에 의한 표면 고정화 방식이 등장하였다.

또한, 고체기질 위에 바이오틴 (biotin) 을 부착한 후 이 바이오틴 층위에 아비딘 (avidin)이나 스트렙토아비딘 (streptoavidin) 을 화학결합 방식에 의해 부착하고, 바이오틴이 부착된 단백질을 이용하는 상중분자층에 의한 단백질 고정화 방식이 문헌 [Science, 1993년 Vol 262, pp 1706-1708]에 발표되었다.

그러나, 기존에 사용되던 물리흡착방식이나 최근에 사용되기 시작한 탄소결합방식과 바이오틴-아비딘 인력을 이용한 방식 등의 단백질 고정화 방법에서 나타나고 있는 문제점은 다음과 같다.

1. 농도 : 기존에 알려져 있는 단백질의 고정화 반응에서 가장 문제가 되는 것은 표면에 고정화된 단백질의 양이 상당히 낮다는 것이다. 표면에 고정화된 단백질의 농도가 낮으면, 고체 기질의 표면에 다른 단백질이 비특이성 고정화 반응을 하여 기질 표면의 빈자리에 고정화될 수 있기 때문에 단백질이 고정화되지 않은 부분을 반응성이 없게 화학적인 처리 등을 하여야 한다. 그러나, 상기 화학적인 처리 과정에서 고정화된 단백질 분자의 활성에 문제가 생길 가능성이 있으며, 분석하려는 특정 단백질을 부착시킬 때에도 이 단백질의 상당히 적은 양만이 인식되기 때문에 분석하고자 하는 단백질의 양이 미량이 되므로 다양한 분석실험 방식을 통하여 확인하여야 한다. 특히, 기질의 단위면적당 그의 표면에 고정화되는 단백질의 양이 많을수록 분석이 쉬워지기 때문에 고정화된 단백질의 양을 최대화한 단백질 단분자층의 개발에 대해 많은 연구가 수행되었으나 아직 만족할만한 결과는 얻지 못하였다.

2. 활성: 화학결합에 의한 방식이나 표면에서의 물리흡착에 의한 방식 등의 기존 고정화 방법에서는 단백질이 기질의 표면에 고정화될 때 용액 상에서 자유로이 떠돌아 다닐때보다 더 쉽게 활성을 잃어 버리는 경우가 많다. 그 이유는 단백질이 고체기질에 고정화될 때 너무 강하게 표면으로 당겨져서 활성위치가 변성되기 때문인 것으로 알려지고 있다.

3. 배향성: 기존 단백질 고정화 방법에서는 단백질 분자가 표면에 고정화 되면 필연적으로 활성 위치 함유 부분이 고체 기질을 향하게 되어, 실제로 활성이 없는 것과 같은 경우가 생긴다. 이를 배향성 문제라 하며 고정화 단백질 분자의 약 절반 정도에서 이런 현상이 발생하게 된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 전술한 기존의 단백질 고정화 방법에서 발생하는 농도, 활성 및 배향성 등의 문제를 해결하고자, 단백질 고정화 방법에서 사용하는 자기조립 단분자층에 필수적인, 단백질의 암모늄기를 인식할 수 있는 인식기를 가진 캘릭스크라온 유도체 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

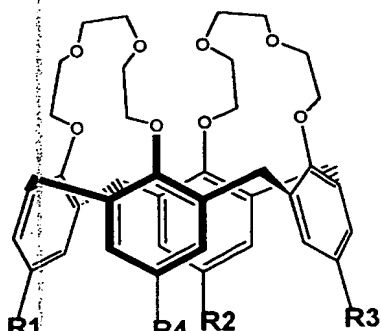
추가로, 본 발명의 목적은 상기 화합물을 금기질에 부착함으로써 모든 종류의 단백질이 아무런 가공과정없이 표면에 백백하게 들어찬 단백질 단분자층을 생성할 수 있는, 캘릭스크라온 유도체의 자기조립 단분자층을 제공하는 것이다.

추가로, 본 발명의 목적은 상기의 자기조립 단분자층 위에 분자량이 20,000(20KD) 이상인 항원, 항체, 및 효소 등의 단백질 분자를 고정시키는 단백질의 고정화 방법에 관한 것이다.

발명의 구성 및 작용

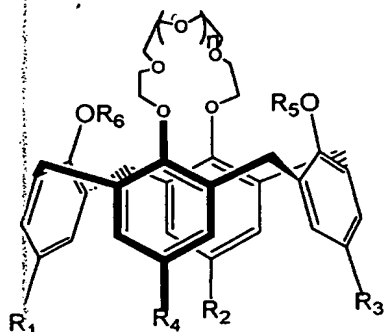
단백질 고정화 방법에서 사용하는 자기조립 단분자층에 필수적인 신규한 캘릭스크라온 유도체는 하기 화학식 1 내지 3의 구조를 갖는 화합물이다.

화학식 1



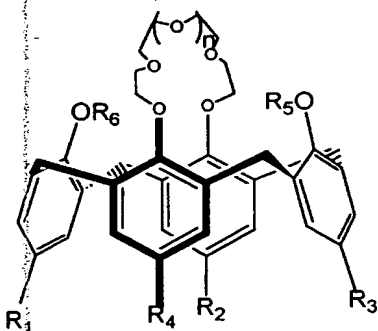
상기 식 중에서, R1, R2, R3 및 R4 는 서로 독립적으로 $-CH_2SH$ 기를 나타내거나, 또는 R1 내지 R4 중 2개가 서로 결합하여 각각 $-CH_2-S-S-CH_2-$ 기를 형성할 수 있다.

화학식 2



상기 식 중에서, n 은 1이고, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 은 각각 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내거나, 또는 R_1 및 R_3 은 각각 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내고, R_2 및 R_4 는 각각 H를 나타낼 수 있으며, R_5 및 R_6 은 서로 독립적으로 $-\text{H}$, $-\text{메틸}$, $-\text{에틸}$, $-\text{프로필}$, $-\text{이소프로필}$, $-\text{이소부틸}$ 을 나타낸다.

화학식 3



상기 식 중에서, n 은 2이고, R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 서로 독립적으로 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내거나, 또는 R_1 및 R_3 은 각각 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내고, R_2 및 R_4 는 각각 $-\text{H}$ 기를 나타낼 수 있으며, R_5 및 R_6 은 서로 독립적으로 $-\text{H}$, $-\text{메틸}$, $-\text{에틸}$, $-\text{프로필}$, $-\text{이소프로필}$, $-\text{이소부틸}$ 을 나타낸다.

상기 화학식 1 내지 3의 화합물을 일반적으로 명명할 때 캘릭스크라운 유도체라고 하며, 구체적으로는 화학식 1의 화합물은 캘릭스[4]아렌-비스크라운-4로, 화학식 2의 화합물은 캘릭스[4]아렌-크라운-5로, 화학식 3의 화합물은 캘릭스[4]아렌-크라운-6으로 명명한다.

화학식 1 내지 3의 화합물을 합성하기 위한 출발 물질은 R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 가 H이고, R_5 및 R_6 이 $-\text{CH}_3$ 인 캘릭스[4]아렌-크라운-5 와 -6, 및 R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 가 H인 캘릭스[4]아렌-비스크라운-4로서, 이들 출발물질은 문헌 [미국화학회지 J. Am. Chem. Soc., 1995년, Vol 117, pp 2767-2777; Tetrahedron, 1997년, Vol 53, pp 3767-3776]에 발표된 방법에 따라 합성한다.

본 발명의 화학식 1 내지 3의 화합물은 상기 공지된 방법에 의해 합성된 출발물질을 클로로메틸화반응시켜 R_1 내지 R_4 중 2개 혹은 4개의 작용기를 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 기로 변환시킨 후 각각의 Cl 기를 티올 ($-\text{SH}$) 기로 변환시키거나 혹은 두개의 Cl기를 디설파이드 ($-\text{S}-\text{S}-$)기로 변환시켜 제조한다.

기존의 클로로메틸기 부착반응에서는 크라운기에 클로로메틸기를 부착할때 사용하는 루이스산 (SnCl_4 등) 때문에 크라운기가 쉽게 깨어지나 본 발명의 제조 방법은 크라운기에 전혀 영향을 주지 않고 클로로메틸기만 부착시킬 수 있으며, 고수율로 캘릭스크라운 유도체를 합성할 수 있다. 본 발명에서는 클로로메틸기로의 변환시약으로 $\text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_2\text{Cl}$ 를 사용하고 루이스 산은 SnCl_4 를 사용한다. 클로로메틸기에서 티올이나 디설파이드기로 변환시킬 경우는 NaSH 를 사용하여 직접적으로 티올로 바꾸는 방법과, 티오우레아와 반응시킨 후 NaOH 등의 염기성 수용액에서 환류하여 티올로 변환시키는 방법이 있으며, 이들 방법은 모두 우수한 수율로 화학식 1 내지 3의 화합물을 합성할 수 있다.

추가로, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 3의 화합물을 금 기질에 부착함으로써 모든 종류의 단백질이 아무런 가공과정없이 표면에 백백하게 들어한 단백질 단분자층을 생성할 수 있게 하는, 캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층을 제공하는 것이다.

도 1은 본 발명의 캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층의 제조 과정을 개략적으로 나타낸다.

캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층을 제조하기 위한 구체적인 방법은 다음과 같다 :

CHCl_3 등의 유기용매에 화학식 1 내지 3의 화합물을 1~3 mM 농도로 녹인 용액을 제조한다. 금 기질을 상기 제조된 용액 중에 넣어 1 내지 24 시간 동안 담근 후 꺼내어 이를 아세톤 용액 및 물로 각각 세척한 후 건조시키면 도 1과 같은 캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층이 완성된다. 여기에서 사용되는 금 기질은 여러가지 형태로 사용될 수 있으나, 일반적으로 유리, 용융 석영, 실리콘 웨이퍼, 플라스틱 등에 크롬(Cr)이나 티타늄(Ti) 등을 5~10nm로 증착시킨 후 금을 200nm 정도 증착시킨 기질이다. 이렇게 제조된 금 기질은 사용 직전에 피란하(piranha) 용액(과산화수소수:진한황산을 1:2~3 정도의 비율로 섞은 혼합 용액)에 1분 정도 담근 후 물로 세척하여 사용하는 것이 일반적이나, 염기성 용액에서 끓여 사용하거나 오존 중에 통과시켜 주어도 된다. 클리닝 후에는 되도록 빨리 사용하여야 하며, 단분자층의 생성은 표면반사적외선 분광분석법을 이용하여 확인한다.

•추가로, 본 발명은 캘릭스크라운 유도체의 크라운 고리를 이용하여 단백질의 활성위치의 반대쪽에 다량 분포하는 암모늄기등의 양이온을 인식하는 다중 이온인식에 의한 단백질 고정화 방법을 제공하는 것이다.

•본 발명의 고정화 방식은 단백질을 이용한 모든 종류의 분석 방법에 기반이 되는 것으로 아직 세계적으로 비슷한 연구결과도 발표된 적이 없는 발명이다.

•본 발명의 고정화 방법은 기존의 단백질 고정화 반응에서 사용되어 왔던 단백질 분자의 화학적인 처리나 유전공학적인 변환없이 분자인식작용 중 하나인 다중이온 인식 작용을 이용하여 단백질을 고체기질의 표면에 간단히 고정화시켜, 고체기질 위에 다른 단백질분자가 고정화될 수 없을 만큼 원하는 단백질 분자가 뿔뿔하게 들어차 있는 단백질의 단분자층을 제공할 수 있다.

•상기와 같은 단백질의 단분자층이 제조된다면 다음 측정에 영향을 미치지 않을 정도로 빈자리가 거의 존재하지 않기 때문에 종래 고정화 방법에서 발생했던 농도문제와 비특이성 고정화 반응에 대한 문제가 동시에 해결될 수 있다.

•또한, 본 발명은 기존의 고정화 반응과 확연히 구분되는, 화학결합력에 비해 상대적으로 약한 힘에 의해 고정화시키는 다중 이온 인식에 의해 고정화되기 때문에 표면에 끌리는 힘에 의한 활성감소효과가 기존 방법에 비해 상대적으로 작게 나타나며 이는 단백질 이중분자층의 제조에 의해 확인할 수 있다.

•추가로, 본 발명의 방법에 의해 제조된 단백질 단분자층에 있어서 대부분의 항원, 항체, 및 효소를 포함하는 단백질은 암모늄기등의 양이온이 가장 많이 분포하는곳이 대부분의 경우 단백질 활성위치의 반대편에 있기 때문에 배향성 문제를 적절한 수준에서 해결할 수 있다.

•실제로 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 항원-항체 반응을 항원 혹은 항체 단분자층에서 실시하여 실시간대에 미세무게변화를 직접적으로 측정하면, 모든 고정화된 항원 분자에 항체 분자가 혹은 고정화된 모든 항체 분자에 항원 분자가 부착되는 결과를 얻을 수 있어서, 본 발명에 의해 제조된 단백질 단분자층에 고정화된 단백질의 활성이 기존의 방식에 비해 획기적으로 개선된다는 것을 확인할 수 있다.

•도 2는 화학식 1 내지 3의 화합물에 의해 제조된 자기조립 단분자층에 캘릭스크라운 분자의 분자인식기능으로 인하여 단백질의 $-\text{NH}_3^+$ 기가 자발적으로 고정화되는, 다중 이온인식에 의한 항원, 항체, 효소 등의 단백질의 고정화 반응을 개략적으로 나타내는 도면이다. 단백질이 녹아 있는 용액에 화학식 1 내지 3의 화합물의 자기조립 단분자층을 담구면 자발적인 인식작용에 의한 고정화 반응에 의해 약 3분에서 1시간 사이에 표면에 완전히 단백질로 덮인 단백질의 단분자층이 형성된다. 원자힘 현미경을 사용한 표면분석과 수정진동미시저울(Quartz Crystal Microbalance : QCM)을 이용하여 용액상에서 단백질분자가 화학식 1 내지 3의 화합물의 자기조립 단분자층 상에 고정화되어 완전한 단백질 단분자층을 형성하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 순환전류법(cyclic voltammetry)을 이용하여 정전용량(capacitance)을 측정한다. 각 경우에 공통적으로 완전한 단백질 단분자층의 생성이 1시간 정도에 완성되는 것을 확인할 수 있다.

•도 3은 도 2에서 제조된 단백질 단분자층의 활성을 연구하기 위한 것으로 항원 혹은 항체의 단분자층과 용액상의 단백질과의 인식과정을 나타내고 있다. 수정결정미시저울을 이용하여 단백질 단분자층이 생성될때와 단백질 이중분자층이 생성될때의 미세한 무게변화를 측정하여 실험한 결과, 항원 단분자층을 이용한 경우 이에 최적의 인식을 보이는 항체와의 항원-항체 인력에 의한 항체의 인식정도가 그 항체를 이용하여 단백질 단분자층을 제조할때와 거의 일치하는 변화가 나타난다. 또, 역으로 항체의 자기조립 단분자층과 용액상의 항원과의 반응에서도 항원의 자기조립 단분자층 제조시와 거의 동일한 결과가 얻어진다. 이는 다중이온인식에 의해 화학식 1 내지 3의 화합물의 자기조립 단분자층 위에 고정화된 단백질의 활성이 대단히 뛰어나다는 것을 의미하는 것이다.

•본 발명의 단백질 단분자층의 제조 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다:

분자량이 20,000 (20KD)이상인 단백질을 수nm 내지 수 μm 의 농도로 함유하고 있는 완충 용액에 상기에서 제조한 캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층을 넣은 후 1시간 내지 2시간이 지난 후에 꺼내면 단백질 단분자층의 제조가 완료된다. 이때, 단백질이 녹아있는 완충 용액의 양이온 농도가 낮을수록 더 빠르게 단분자층이 생성되며, 이의 생성 과정은 수정결정미시저울을 이용한 무게변화의 측정에 의해 확인된다. 단백질 단분자층 제조시의 최적의 양이온 농도는 0.83 mM - 1.4mM 로서, 0.083mM 이하의 낮은 농도에서나 10 mM 이상의 높은 농도에서는 단백질 단분자층의 생성시간이 3시간 이상으로 오래 소요된다.

단백질 단분자층이 제조된 후 표면에서 단백질 분자들이 어느정도 완전하게 고체 기질 위를 채우고 있는가는 nm 크기까지를 확인할 수 있는 원자힘 현미경을 사용하여 직접적으로 확인할 수 있다.

도 5 및 도 6은 캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층 위에 생성된 두종류의 항원, 항체의 단분자층과 사용한 금기질의 표면과의 차이를 나노미터 수준에서 확인한 AFM 이미지이다. 금 기질의 표면과 비교하면 표면에 단백질 분자들이 자리잡고 있음을 알 수 있으며 다른 단백질분자가 들어갈만한 크기의 빈자리가 없이 완전한 단분자층을 이루고 있음을 확인할 수 있다.

또한, 높이의 변화를 보면 단백질이 거의 단분자층으로 이루어져 있고 그위에 다른 단백질이 올라가 있게 된다면 높이차가 단백질의 직경으로 보아 몇 나노미터 이상의 높이차를 보이게 될 것인데, 여기에서는 그정도의 높이차를 보이지 않는 것으로 보아 단백질 단분자층위에 동일한 종류의 단백질이 물리흡착에 의해 이중층의 형태로 올라가 있는 현상은 거의 나타나지 않음을 알 수 있다. 이는 분자인식력을 보이는 크라운 고리의 특성에 의해 캘릭스크라운 유도체의 자기조립 단분자층에서 단백질의 암모늄기가 인식될 때에만 단백질분자의 고정화가 진행되고, 적절한 크기의 공간이 더 이상 남지 않을 때에는 단백질이 금기질의 표면에 접근할 수가 없어 단백질의 표면 고정화가 더 이상 진행이 되지 않고 또 고정된 단분자층위에 단백질이 더 올라가지 않기 때문인 것이다.

상기 결과는 QCM을 이용한 무게 변화를 측정할 때에도 확인되었는데 단분자층이 제조된 뒤에는, 동일한 단백질의 농도를 증가시키더라도 더 이상의 무게 변화는 나타나지 않는다. 즉, 동일한 단백질 분자간의 물리흡착은 단백질 단분자층이 일단 형성된 후에는 거의 진행되지 않는다는 것을 알 수 있다.

도 4a, 4b 및 4c는 표면에서 일어나는 나노그림에서 마이크로그림 수준의 무게변화를 직접적으로 측정할 수 있는 수정결정미시저울을 사용하여 단백질 단분자층의 생성을 측정한 것이다. 표면에 고정화된 물질의 무게가 증가하면 수정판의 진동수가 상대적으로 감소하게 되며, 이 진동수의 감소값을 하기 사우베리식 (Saubery Equation)을 대입하여 무게의 변화로 나타내게 된다.

수학식 1

$$\Delta f = -C\Delta m \dots\dots\dots (1)$$

상기 식에서, C_1 의 값은 $2.26 \times 10^2 \text{ cm}^2 \text{ MHz/g}$ 으로서, 1Hz의 변화는 4.42 ng/cm^2

²의 무게 변화를 나타낸다. 상기 식에 따르면, 도 4c의 β -Gal (β -갈락토시다아제) 항체투입에서 보는 바와 같이 분자량이 160KD 인 항체를 사용한 경우에는 표면에 고정화된 분자의 무게가 약 $4.2 \mu\text{g/cm}^2$ 수준이며 이는 약 26 피코몰의 분자가 표면에 고정화된다는 것을 의미한다. 도 4a와 도 4b에서 도시되어 있는 바와 같이 무게가 상대적으로 가벼운 β -Gal 항원이나 GST (글루타티온-S-트랜스퍼라아제) 항원인 경우에는 상대적으로 고정화된 단백질의 무게가 작게 나타남을 알 수 있다 (도 4a 및 4b 참조).

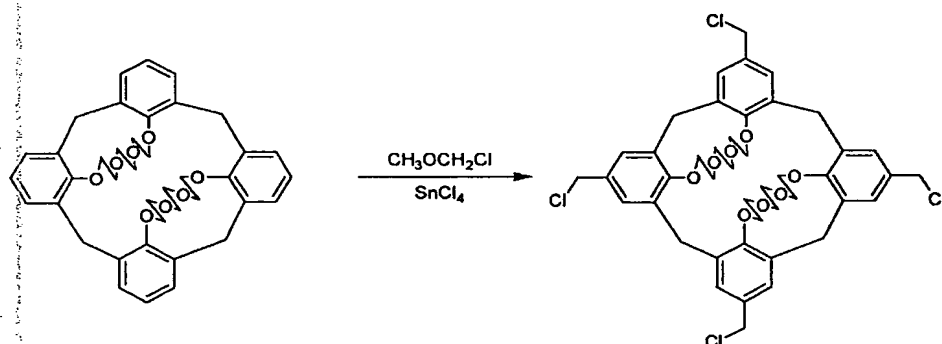
고정된 단백질이 대단히 높은 활성을 나타냈음, 도 4a 및 4c 에서 나타나는 바와 같이 고정화된 β -Gal (β -갈락토시다아제) 항원이나 항체에 대응하는 항체나 항원을 각각 투입하거나, GST (글루타티온-S-트랜스퍼라아제) 항원 단분자층에 항체 (GST 항체)가 10-20%의 농도로 존재하는 단백질 혼합용액을 투여하여 항원-항체 인력을 통해 표면에 고정화 되는 항체의 양을 직접 무게 변화로 측정하여 알 수가 있다. 도 4b 는 GST 항원의 단분자층에 분자량이 150KD인 GST 항체가 부착될 때의 무게 변화를 나타내는데, 그 무게변화는 도 4a에서 보는 것처럼 항원 단분자층에 GST 항체와 분자량이 비슷한 β -Gal 항체 (분자량 160KD)를 투입할 때와 거의 비슷함을 알 수 있다. 도 4c는 β -Gal 항체단분자층 제조시의 무게변화를 나타내는데, 도 4a에서 보는 것처럼 β -Gal항원의 단분자층에 β -Gal 항체가 이중분자층으로 부착될때의 무게변화와 거의 같다.

이 결과는 크기가 큰 항체 분자가 크기가 상대적으로 작은 항원 분자의 단분자층에 부착될때 1대1 결합을 하면 항체의 이중 분자층이 단분자층 정도로 뻗뻗하게 생성된다는 것을 의미한다. 도 4c는 항체 단분자층위에 상대적으로 크기가 작은 항원 분자가 부착될때 거의 1대1 수준의 결합이 이루어지더라도, 항원의 단분자층 제조시보다 실제로 올라가는 항원의 분자수가 적으므로 무게변화가 항원 단분자층 제조시보다 적음을 보여준다. 단분자층의 제조에 필요한 농도의 항원이 포함되어 있는 완충용액을 투여하여 단분자층의 제조를 수행한 뒤 다시 항원을 더 높은 농도로 투여하였을때에는 더 이상의 의미있는 무게변화가 나타나지 않아, 단분자층의 제조 이후에는 더 이상 동일한 단백질이 물리흡착에 의해 부착되지는 않는다는 것을 알 수 있다.

각 실험시에 사용한 항원 혹은 항체의 용액을 다음 단백질 투입전에 제거하고 완충용액을 채운 뒤 다음 단백질을 투입한다. 위의 실험결과를 표면에 고정화된 항원과 항체가 대응하는 단백질과 반응 (항원-항체반응)을 하기에 충분한 정도의 활성을 유지하고 있다는 것을 보여주고 있다

이하에서 상술한 본 발명을 예증하기 위하여 하기 실시예를 제공하고자 하나, 이 실시예가 본 발명의 범위를 한정하거나, 제한하는 것은 아니다

실시예 1

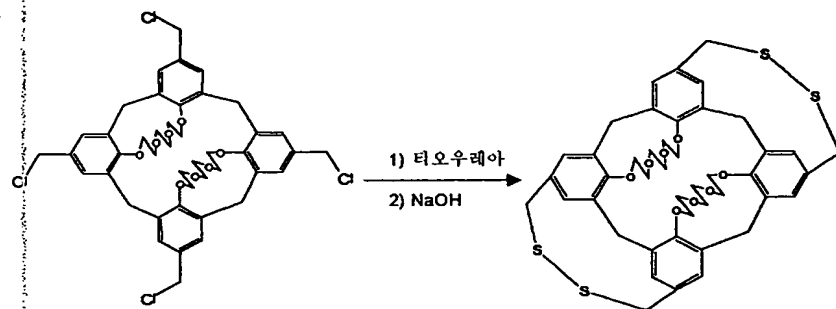


CABCR-4

TCCABCR-4

^{13}C NMR(CDCl_3) : δ 155.7, 134.5, 131.8, 128.1, 73.3, 72.7, 70.9, 31.1, 29.7, 22.6

실시예 3



TCCABCR-4

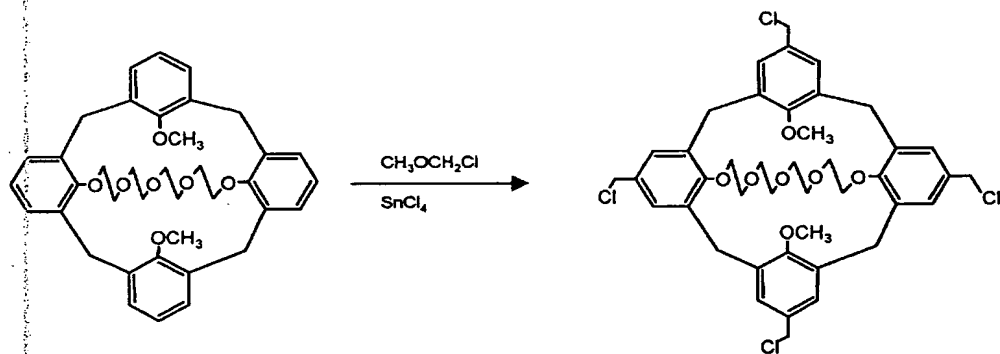
DDSCABCR-4

◦ TCCABCR-4 115mg (0.136mmol)과 티오우레아 41.3mg (0.544mmol)을 에탄올 30mL에 녹인다. 용매내의 산소를 제거하지 않고 반응을 수행한다. 반응물을 45. C~55. C에서 60분동안 소닉 처리한다. 이 혼합물에 NaOH 32.64mg (0.816mmol)을 넣어 준 뒤 30분 동안 소닉 처리한다. 반응후 1N HCl을 사용하여 반응 용액의 pH를 4에 맞춘다. 반응물을 CH_2Cl_2 30 내지 50 ml에 녹인 후 물로 린스하고 유기용매를 건조시킨 후 유기용매를 감압하에 제거하고 수득되는 물질을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (용출액 : 헥산-에틸 아세테이트) 로 정제하여 DDSCABCR-4 60 mg을 수득한다.

^1H NMR(CDCl_3) : δ 6.81–6.50 (m, 8H, ArH), 4.92 (2H, d, $J = 13$ Hz, ArCH_2Ar), 4.32–4.06 (m, 2H, ArCH_2Ar , 8H, $-\text{OCH}_2-$, 8H, $\text{CH}_2\text{S}-\text{CH}_2\text{S}-$), 3.86–3.68 (m, 16H, $-\text{OCH}_2-$), 3.18–3.11 (4H, ArCH_2Ar)

^{13}C NMR(CDCl_3) : δ 155.7, 135.4, 134.5, 131.8, 128.1, 73.3, 72.6, 70.9, 70.4, 31.1, 29.7

실시예 4



DMCACR-5

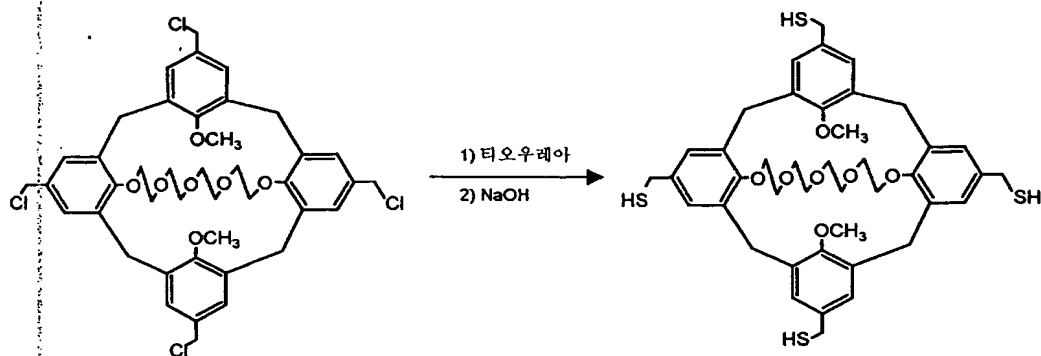
TCDMACR-5

건조된 용기에 CHCl_3 20 mL을 넣고 이 용기를 얼음조에 넣어 차게 하면서 질소 교류하에 교반시켜 준다. 이 용기에 $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{Cl}$ 0.515 mL (6.56 mmol)을 넣고 2분정도 지난 뒤 SnCl_4 0.612 mL (5.23 mmol)을 3~4분에 걸쳐 천천히 넣어 준다. 15분뒤에 1,3-디메톡시칼릭스[4]아렌크라운-5 (DMCACR-5) 100mg(0.164mmol)을 CHCl_3 적당량 (30 내지 50 ml)에 녹인 후 상기 용기에 천천히 가한다. DMCACR-5를 모두 가한 후 5분동안 얼음조에서 교반하고 난 뒤 10분에 걸쳐 상온으로 온도를 올린 다음 한시간 동안 반응시킨다. 반응 용액에 CH_2Cl_2 적당량 (30 내지 50 ml)을 가하여 희석시킨 후 얼음을 넣어 차가운 상태에서 교반하여 여분의 SnCl_4 를 제거한다. 유기층을 분리한 다음 차가운 탈이온수로 2번 세척한다. 그 후 건조제를 넣어 건조시킨 뒤 이를 제거하고 용매를 감압증류하여 제거한 다음 결과물 TCDMACR-5 (99 mg, 75% 수율)을 수득한다.

^1H NMR(CDCl_3) : δ 7.13 (4H, bs, ArH), 6.48 (4H, bs, ArH), 4.84–4.62 (8H, m, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 4.375 (4H, d, $J = 13\text{Hz}$, ArCH_2Ar), 4.14 (6H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.99–3.58 (16H, m, $-\text{OCH}_2-$), 3.17 (4H, d, $J = 13\text{Hz}$, ArCH_2Ar)

^{13}C NMR(CDCl_3) : δ 159.5, 155.7, 136.7, 133.8, 131.4, 128.9, 128.2, 126.9, 73.0, 71.5, 70.8, 70.6, 61.4, 46.9, 46.5, 31.1

실시예 5

**TCDMCACR-5****TMDMCACR-5**

• TCDMCACR-5 100mg (0.124 mmol)과 티오우레아 38mg (0.50 mmol)을 에탄올 25 mL에 녹인다. Ar가스를 1분가량 혼합물에 통과시킨 뒤 Ar 기체분위기하에서 반응을 수행한다. 반응물을 45. C~55. C에서 60분동안 소닉처리한다. 이 혼합물에 NaOH 30 mg (0.75 mmol)을 넣어 준 뒤 30분 동안 소닉처리한다. 반응후 1N HCl로 반응용액의 pH를 4에 맞춘다. 반응물을 CH₂Cl₂ 적당량 (30 내지 50 ml)에 녹인 뒤 물로 3번 린스하고 이를 건조시킨 다음 유기용매를 감압하에서 제거한 후 수득되는 물질을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (용출액: 헥산-에틸 아세테이트)로 정제하여 TMDMCACR-5 55 mg을 수득한다.

¹H NMR(CDCl₃) : δ 7.11-6.87 (4H, m, ArH), 6.52-6.45 (4H, m, ArH), 4.40-4.36 (4H, m, ArCH₂Ar), 4.12 (6H, s, -OCH₃), 4.06-3.40 (2H, m, -OCH₂-, -CH₂SH), 3.20-3.16 (4H, m, ArCH₂Ar)

¹³C NMR(CDCl₃) : δ 159.3, 155.4, 136.7, 133.6, 128.4, 127.6, 127.3, 122.5, 73.0, 71.5, 71.1, 70.8, 61.2, 31.1, 28.9, 28.4

실시예 6

• 도 1과 같은 캘릭스크라온 유도체의 자기조립 단분자층을 TMDMCACR-5 화합물을 이용하여 제조한다. 진공증착된 금 기질을 클리닝한 뒤 질소분위기하에서 건조시킨다. 이 기질을 TMDMCACR-5 가 2mM 농도로 녹아있는 CHCl₃ 적당량 (30 내지 50 ml)의 용액에 3시간 정도 담근다. 금 기질을 아세톤으로 씻고 건조시켜 TMDMCACR-5 자기조립 단분자층의 제조를 완료한다. 이 기질에 외부반사 적외선 분광분석(FT-IR, ERS)을 수행하면 1040 cm⁻¹에서 크라운 고리의 특징적인 C-O 스트레칭 모드와 1480 cm⁻¹에서 캘릭스아렌의 특징적인 방향족 스트레칭 모드의 강한 흡수밴드가 나타나므로 캘릭스크라온 화합물이 기질의 표면에 단분자층을 형성하고 있음을 확인할 수 있다.

실시예 7

도 2와 같은 단백질 단분자층은 다음과 같이 제조할 수 있다. 실시예 6에서 제조한 금 기질 상의 캘릭스크라온 유도체의 단분자층을 β-갈락토시다아제 항원이 0.1 μM 농도로 존재하는 0.83 mM PBS (인산염 완충용액, Na⁺ 및 K⁺ 함유) 완충용액에 담그고 1시간 후에 완충 용액으로 세척하면 β-갈락토시다아제 항원 단분자층이 제조된다. 이 실험의 결과는 수정결정미시저울을 이용하여 측정한 도 4a에 나타나 있다. 실시간대에 이 단백질 단분자층의 제조를 수행하면 2.4μg/cm² 즉 2.4μg정도의 항원이 1 cm²에 고정화되게 된다. 또한, QCM 실험시에 고정화가 이루어지기까지는 3분정도의 시간이 필요하다. 고정화된 항원 단분자층에 대하여 원자힘 현미경을 이용하여 실제 사용한 기질과 표면에서의 변화를 관찰한 실험결과가 도 5와 6에 제시되어 있다. 도 5 및 6을 보면 표면이 단백질 단분자층 제조전후가 완전히 상이하여 단백질이 표면에 고정화되어 있다는 것을 확인할 수 있다. 비록 3분 정도에 단백질 단분자층의 제조가 완료되지만 원자힘 측정시의 팁(AFM tip)에 의한 마찰력을 견디려면 1시간의 고정화 시간이 필요하다. 도 4a, 4b 및 4c에서는 첫 번째 투입한 단백질은 모두 0.1 μM의 단백질 농도를 사용한 것이다. 도 4a, 4b 및 4c는 각각의 단백질 단분자층에 대응되는 단백질을 0.1 μM 농도로 투입하였을 때 나타나는 무게변화를 도시한다. 도 4a에서는 항원 단분자층에 160KD의 분자량을 가진 항체 단분자층을 투입할 때 항원의 두배에 가까운 무게변화를 나타내고 있고, 도 4b에서는 가벼운 GST 항원 단분자층에 분자량이 150KD인 항체를 투입했을 때, 160KD 분자량의 항체를 β-갈락토시다아제 항원 단분자층에 투입했을 때와 거의 비슷한 무게 변화가 표면에서 일어나는 것을 보여준다. 이러한 무게변화는 단백질이 표면에 뽁뽁하게 들어찰때의 무게변화와 일치하는 것으로, 이는 표면에 고정화된 단백질들이 활성을 거의 완전하게 유지하고 있다는 것을 나타낸다.

발명의 효과

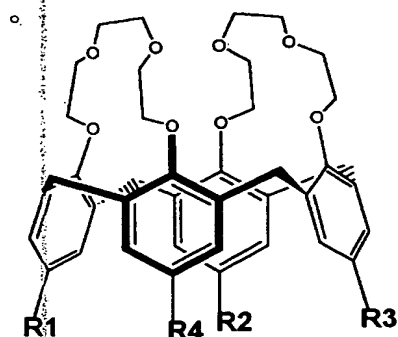
본 발명은 기존의 단백질 고정화 방법으로 사용되던 화학결합방식이나 물리흡착방식등에서 나타나던 문제점을 해결할 수 있는 분자인식이라는 방식을 이용한 새로운 단백질 고정화 반응을 개발한 것이다. 이 방식은 단순히 캘릭스크라온 화합물이 자기조립 단분자층을 이루고 있는 고체 기질을 고정화시킬 단백질 수용액에 담구어 두기만 하면, 1시간 이내에 분자량 20,000 (20KD) 이상의 모든 종류의 단백질을 활성을 잃지않은 상태로 다른 단백질이 고정화될 수 있는 공간을 남기지 않을 만큼 밀집되게 부착시킬 수 있다. 이로 인하여, 비특이성 단백질의 고정화를 유발하던 기존의 고정화 반응에서의 큰 문제점을 해결하는 동시에, 비특이성 단백질의 고정화를 억제하기 위하여 필수적으로 사용하여야 했던 화학 물질의 사용을 불필요하게 하여 시간과 고정화된 단백질의 활성유지를 획기적으로 개선하였으며, 또한 특정 단백질의 인식에 필요한 단백질 단분자층을 직접 제조하여 사용하기 때문에 시간과 경비의 절감효과가 대단히 크다. 또한, 캘릭스크라온 유도체의 자기조립 단분자층의 제조에 필요한 티올화합물은 기존의 방식으로 제조시에는 크라운 고리의 안정성이 문제가 되어 왔으나 본 발명에서 이러한 문제점을 해결하여 높은 수율로 원하는 캘릭스크라온 분자의 합성을 할 수 있게 되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식 1의 캘릭스[4]아렌-비스크라운-4의 유도체.

<화학식 1>

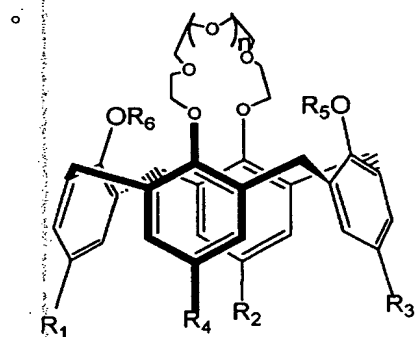


상기 식 중에서, R1, R2, R3 및 R4는 서로 독립적으로 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내거나, 또는 R1 내지 R4 중 2개가 서로 결합하여 각각 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$ 기를 형성할 수 있다.

청구항 2.

하기 화학식 2의 캘릭스[4]아렌-크라운-5의 유도체.

<화학식 2>

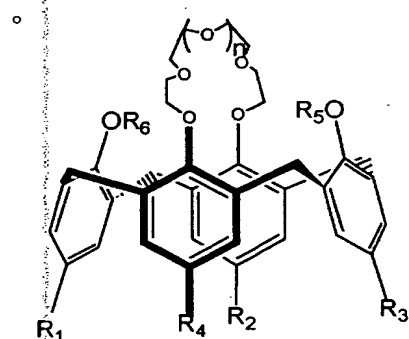


상기 식 중에서, n은 1이고, R1, R2, R3, R4는 각각 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내거나, 또는 R1 및 R3은 각각 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내고, R2 및 R4는 각각 H를 나타낼 수 있으며, R5 및 R6은 서로 독립적으로 $-\text{H}$, $-\text{메틸}$, $-\text{에틸}$, $-\text{프로필}$, $-\text{이소프로필}$, $-\text{이소부틸}$ 을 나타낼 수 있다.

청구항 3.

하기 화학식 3의 캘릭스[4]아렌-크라운-6의 유도체.

<화학식 3>



상기 식 중에서, n은 2이고, R1, R2, R3 및 R4는 서로 독립적으로 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내거나, 또는 R1 및 R3은 각각 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 기를 나타내고, R2 및 R4는 각각 $-\text{H}$ 기를 나타내며, R5 및 R6은 각각 $-\text{H}$, $-\text{메틸}$, $-\text{에틸}$, $-\text{프로필}$, $-\text{이소프로필}$, $-\text{이소부틸}$ 을 나타낼 수 있다.

청구항 4.

상기 제 2항 또는 제 3항에 기재된 화학식에서 R1, R2, R3 및 R4가 H이고, R5 및 R6이 $-\text{CH}_3$ 인 화합물 또는 상기 제 1항에 기재된 화학식에서 R1, R2, R3 및 R4가 H인 화합물을 클로로메틸화반응시켜 R1 내지 R4 중 2개 혹은 4개의 작용기를 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 기로 변환시킨 후, 각각의 Cl기를 티올 ($-\text{SH}$)기로 변환시키거나, 혹은 두개의 Cl기를 디설피드 ($-\text{S}-\text{S}-$)기로 변환시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 상기 제 1항 내지 제 3항의 캘릭스크라운 유도체의 제조 방법.

청구항 5.

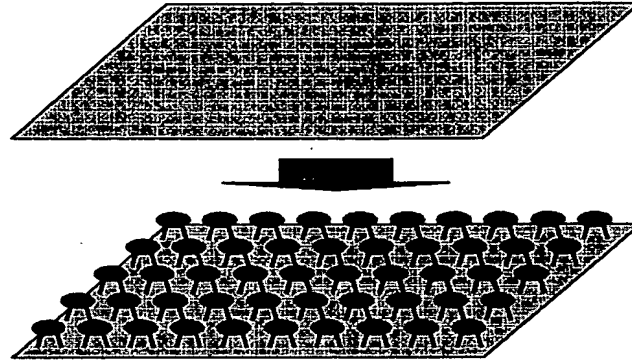
·상기 제 1 항 내지 제 3 항의 화합물이 1 내지 3 mM 농도로 녹아 있는 유기 용액에 진공 증착된 금 기질을 1 내지 24 시간 동안 담구어 제조되는 것을 특징으로 하는 제 1 항 내지 제 3 항의 캘릭스크라온 유도체의 자기조립 단분자층.

청구항 6.


·상기 제 5 항의 캘릭스크라온 유도체의 자기조립 단분자층을 분자량이 20,000 (20KD) 이상의 단백질이 수nm 내지 수 μ m 의 농도로 녹아 있는 완충용액에 1 내지 2 시간 동안 담가두어 상기 단백질을 상기 자기조립 단분자층 위에 고정화시키는 것을 특징으로 하는 단백질 단분자층의 고정화 방법.

도면

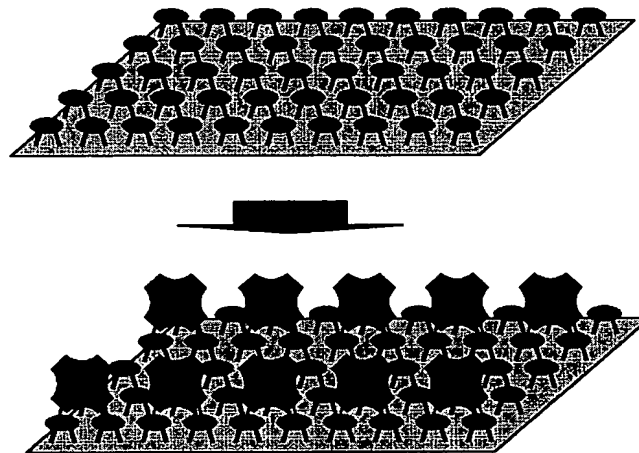
도면 1



캘릭스크라온 자기조립 단분자층

 = 캘릭스크라온

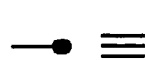
도면 2



단백질 단분자층

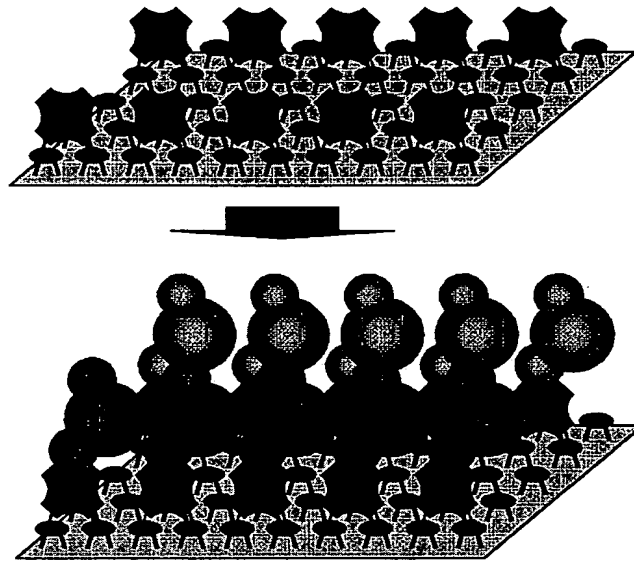


단백질 (항원, 항체, 효소)



$\equiv \text{NH}_3$

도면 3

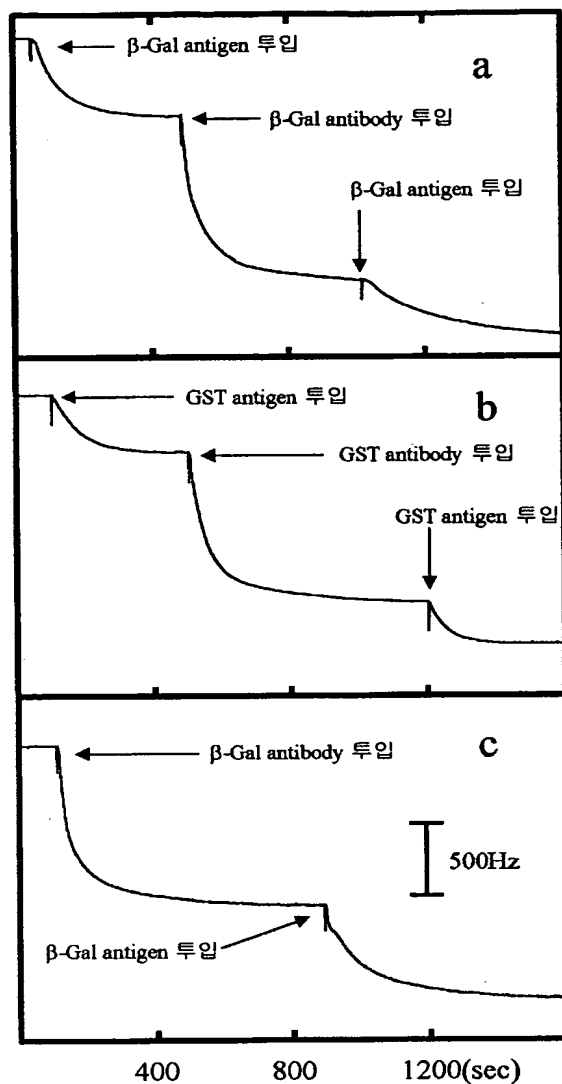


단백질 이중분자층

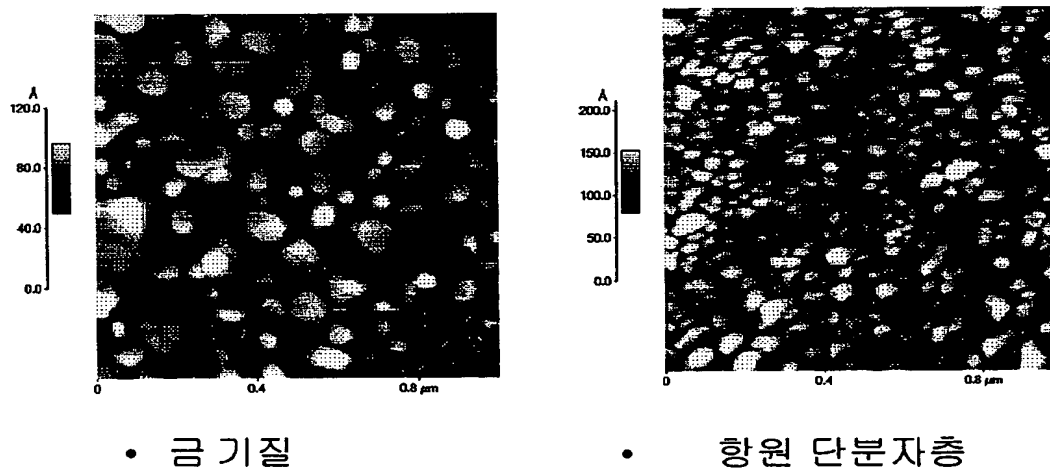


= 단백질 (항원, 항체, 효소)

도면 4



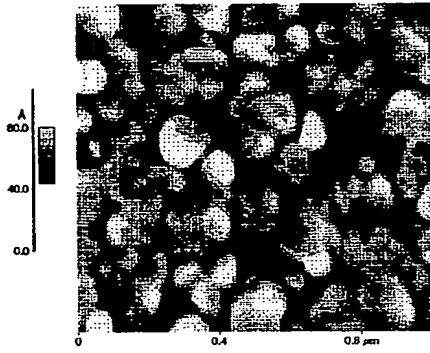
도면 5



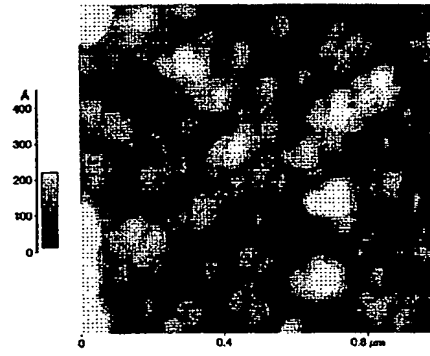
• 금 기질

• 항원 단분자층

도면 6



- 금 기질



- 항체 단분자층

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.